

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年6月10日 (10.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/048498 A1

- (31) 国際特許分類: C09K 15/34, 山市 久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイオサイ
A23L 1/30, A61K 7/00, 7/48 エンス開発センター内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014885 (74) 代理人: 酒井 一, 外(SAKAI,Hajime et al.); 〒102-
0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井
町TBRビル Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2003年11月21日 (21.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-341191
2002年11月25日 (25.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式
会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP];
〒104-8402 東京都中央区築地6丁目19番20号
Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永峰 賢一
(NAGAMINE,Kenichi) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東
村山市久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイ
オサイエンス開発センター内 Tokyo (JP). 林 美希
(HAYASHI,Miki) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東村山
市久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイオサイ
エンス開発センター内 Tokyo (JP). 山崎 かおり
(YAMASAKI,Kaori) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東村
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIOXIDANT, SKIN PREPARATION FOR EXTERNAL USE, COSMETIC AND FOOD

(54) 発明の名称: 抗酸化剤、皮膚外用剤、化粧品及び食料品

(57) Abstract: An antioxidant enabling the effective use of acerola seeds, which have been discarded as waste, having a high safety and showing an excellent antioxidant effect when employed in a skin preparation for external use, a cosmetic, a food, etc.; a skin preparation for external use, a cosmetic or a food comprising the same which contains, as the active ingredient, an acerola seed extract.

(57) 要約: 廃棄処理されていたアセロラ種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、皮膚外用剤、化粧品や食料品等に利用して優れた抗酸化作用等を示す抗酸化剤、これを含む皮膚外用剤、化粧品又は食料品であって、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む。

WO 2004/048498 A1

明細書

抗酸化剤、皮膚外用剤、化粧品及び食料品

技術分野

本発明は、アセロラ種子の抽出物を有効成分とする抗酸化剤、これを用いた皮膚外用剤、化粧品及び食料品に関する。

背景技術

食品、化粧品、医薬品等の物品において油脂類を含む場合、その貯蔵、保存、加工の過程において最も問題になるのは、空気中の酸素による油脂成分等の酸化や過酸化である。とりわけ、油脂中に含まれるリノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸は、酸素により容易に過酸化されて過酸化脂質やフリーラジカルを生成し、更には発癌性物質をも生成することが知られている。このような酸化や過酸化が起こると、着色、変色、変性、異臭あるいは栄養価の有効性の低下ばかりか、毒物の生成等が生じ、製品の品質の劣化を招く。

そこで、前述の不飽和脂肪酸の酸化及び過酸化を抑制し、品質の劣化を防ぐために従来から種々の抗酸化剤が用いられている。抗酸化剤は、酸化の際に生ずるペルオキシドラジカルに作用し、酸化の連鎖反応を停止させるか、あるいはフリーラジカルに作用して酸化反応を停止させる。抗酸化剤としては、従来から、例えば、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)やブチルヒドロキシトルエン(BHT)等の合成抗酸化剤が一般に用いられている。ところが、近年、合成抗酸化剤の使用が増えるにつれその安全性が問題にされ、消費者の拒否反応が強くなってきていると共にその使用量も減っている。また、これら合成抗酸化剤は、油溶性であるため水溶液への使用が困難である。

一方、安全性の高い天然物由来の抗酸化剤としては、例えば、天然ビタミン E(α -トコフェロール)、ビタミン C 等が知られている。しかし、これら天然物由来の抗酸化剤は、極端な脂溶性又は水溶性という性質を有しているため、その利用には限度が生じる。また、その活性が長時間安定に持続しない等の欠点もある。

従って、抗酸化活性が強く、水への溶解性に富み、しかも抗酸化活性が長時間安定である天然物由来の抗酸化剤が強く求められている。

また、皮膚の水分保持、柔軟性、弾力性に作用する物質として、コラーゲンやヒアルロン酸などが知られている。コラーゲンは、皮膚では真皮の 90% を占め、真皮全体に分布しており、皮膚に適度な弾性及び強度を保持させる。また、ヒアルロン酸は、

皮膚、関節液、硝子体、靱帯など生体に広く分布しており、皮膚において、細胞の接着、細胞の保護、皮膚組織の形成、組織の水分保持、柔軟性の維持などを担っている。生体内でコラーゲンを分解する酵素としてコラゲナーゼ、ヒアルロン酸を分解する酵素としてヒアルロニダーゼが知られているが、これらによってコラーゲンやヒアルロン酸が分解されその量が減少すると、皮膚の潤い、ハリがなくなり、皮膚の老化現象であるシワやたるみが起こるといわれている。

そこで、皮膚外用剤や各種化粧品に、皮膚の老化防止やしわ防止作用等を期待してこれら酵素の活性を阻害する物質等を配合することが提案され、従来、様々なコラゲナーゼ活性阻害剤やヒアルロニダーゼ活性阻害剤が開発されている。

ところで、アセロラの果実は、豊富なビタミン C を含む植物として近年知られるようになり、現在では世界各国で飲料や健康食品として用いられている。また、豊富なビタミン C を含むアセロラの果実は、その抽出物に含まれるビタミン C による抗酸化作用等を期待して化粧品に用いられるようになっている(特許第 2814094 号明細書(特開平 2-200610 号公報)、特開 2000-212026 号公報、特開 2000-212027 号公報、特開 2000-212032 号公報)。

しかし、アセロラの果実において化粧品や食料品に利用されているのは、ビタミン C を多く含む果肉のみであり、その種子は、有効利用の途がほとんど見出されておらず、大部分が廃棄されているのが現状である。最近、アセロラ種子を含む植物の種子を水蒸気蒸留法により処理して得られる水蒸気蒸留水を、皮膚感触改善効果を期待して化粧品に配合した組成物が提案されている(特開 2001-226218 号公報)が、更なる有効利用の途が望まれている。

また、このようなアセロラの種子は、その含有成分、及びその作用等についてもほとんど知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、従来、そのほとんどが廃棄されていたアセロラ種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、化粧品や食料品等に利用して優れた抗酸化作用を示す抗酸化剤を提供することにある。

本発明の他の目的は、安定した抗酸化作用、コラゲナーゼ活性阻害作用やヒアルロニダーゼ活性阻害作用を期待しうる安全性に優れ、皮膚の老化防止やしわ防止作用が期待しうる皮膚外用剤及び化粧品を提供することにある。

本発明の別の目的は、安定した抗酸化作用を期待しうる安全性に優れた食料品を提供することにある。

本発明者らは、上記目的を解決するために、まず、従来、果汁の圧搾後、廃棄されていたアセロラ種子の有用性について鋭意検討した。その結果、アセロラ種子から得られる抽出物が、強力な抗酸化能、コラゲナーゼ活性阻害能及びヒアルロニダーゼ活性阻害能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む抗酸化剤、更にはコラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤が提供される。

また本発明によれば、前記抗酸化剤を含む皮膚外用剤又は化粧料が提供され、更には前記抗酸化剤、前記コラゲナーゼ活性阻害剤、前記ヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含む皮膚外用剤又は化粧料が提供される。

更に本発明によれば、前記抗酸化剤を含む食料品が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で調製したアセロラ種子抽出物をカラムクロマトグラフィーで分離した各画分の抗酸化活性を薄層クロマトグラフィーを用いて測定した結果を示す写真の写しである。

図2は、実施例2～5で調製したアセロラ種子抽出物の酸化率測定のための吸光度の経時的変化を示すグラフである。

図3は、実施例2～5で調製したアセロラ種子抽出物の14日目の酸化率を示すグラフである。

図4は、実施例6で調製したアセロラ種子抽出物の20日目の酸化率を示すグラフである。

図5は、実施例8で調製したアセロラ種子抽出物の酸化率測定のための吸光度の経時的変化を示すグラフである。

図6は、実施例8で調製したアセロラ種子抽出物の7日目の酸化率を示すグラフである。

図7は、実施例9で行った処方例5及び比較処方例1で調製した化粧水の酸化率測定のための吸光度の経時的変化を示すグラフである。

図8は、実施例10で行った処方例5の化粧水の6ヶ月間に亘るDPPHラジカル消去試験の結果を示すグラフである。

図9は、実施例10で行った処方例6の化粧水の6ヶ月間に亘る DPPH ラジカル消去試験の結果を示すグラフである。

発明の好ましい実施の態様

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の抗酸化剤は、アセロラ種子の抽出物を有効成分として含み、該抽出物は、コラゲナーゼ活性阻害剤及びヒアルロニダーゼ活性阻害剤の有効成分としても有用である。

アセロラ種子は、大西洋のカリブ海西インド諸島を原産とするアセロラ(Acerola、学名:Malpighia emarginata DC)の種子である。

アセロラの果肉はビタミンCが豊富であることが知られ、食料品、化粧品等に利用されているが、その種子は、その有効利用の途がほとんど見出されていない。

アセロラ種子の抽出物は、例えば、抽出溶媒を用いて抽出したものであれば特に限定されず、リノール酸自動酸化抑制能や DPPH ラジカル消去作用等の抗酸化機能を有しておれば、その抽出方法や条件は特に限定されない。また、アセロラ種子の生産地及び品種についても何ら制限されず、例えば、生産地としては、沖縄、ブラジルが挙げられる。

アセロラ種子の抽出物とは、例えば、生のアセロラ種子、その乾燥物、或いは凍結物を、粉砕して加工し、水及び／又は有機溶媒を加えて抽出した抽出物、得られた抽出物を濃縮した濃縮物、また、前記抽出物や濃縮物を更に液液抽出やカラムクロマトグラフィー等で分画精製した分画精製物、これらの乾固物の総称を意味し、その形態は液状、ペースト状、固体のいずれも含む意である。

前記抽出物を得るために用いる有機溶媒は、親水性有機溶媒、疎水性有機溶媒のいずれでもよい。親水性有機溶媒としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール；アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、ピリジン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられる。疎水性有機溶媒としては、例えば、ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。これらの有機溶媒は使用に際しては1種又は2種以上を組み合わせ用いることができる。中でも、水及び／又は

親水性有機溶媒、特に、メタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、水又はこれらの混合物や組合せが好ましい。

抽出条件は特に限定されないが、例えば、温度は5～95℃、好ましくは10～90℃、更に好ましくは15～85℃で、常温でも好適に抽出できる。温度が高い方が、抽出効率が高くなる傾向がある。抽出時間は、数時間～数日間であり、また、抽出に使用する溶媒量は、原料に対して重量比で通常1～20倍量、好ましくは2～10倍量である。

抽出操作も特に限定的ではなく、常法に従って行えばよい。抽出効率を向上させるため、振とう抽出や、攪拌機等を備えた抽出機を用いても抽出することができる。例えば、アセロラ種子を抽出溶媒に浸漬するか、若しくは浸漬せずに、抽出溶媒と共に攪拌、振とうする抽出処理を行い、処理液を、濾過、遠心分離又はデカンテーション等によって抽出液と抽出残渣に分離することにより抽出処理を行うことができ、抽出残渣は更に同様な抽出処理に付しても良い。得られる抽出液はそのまま用いても良いが、必要により、更に濃縮処理及び／又は分画・精製処理することもできる。

前記濃縮処理は特に限定されず、例えば、溶媒除去、水及び／又は有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理、不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液液分配処理、再結晶処理、再沈澱処理、冷却により生じた析出物を回収する処理等、若しくはこれらから選択される2種以上の処理を組合せる方法等が挙げられる。

前記分画・精製処理も特に限定されず、例えば、順相及び／又は逆相クロマトグラフィーによる処理等が挙げられる。

本発明の抗酸化剤の有効成分としてのアセロラ種子の抽出物は、ケルシトリンを含むことが好ましい。また、コラゲナーゼ活性阻害剤及びヒアルロニダーゼ活性阻害剤の有効成分としてのアセロラ種子の抽出物は、ケルシトリンを含んでいても良い。

本発明の抗酸化剤、更にはコラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤において、有効成分であるアセロラ種子の抽出物の使用量は、使用形態等により適宜選択することができる。

本発明の皮膚外用剤及び化粧品は、前記本発明の抗酸化剤を含む。また、前記抗酸化剤、前記コラゲナーゼ活性阻害剤及び前記ヒアルロニダーゼ活性阻害剤の少なくとも1種を含む皮膚外用剤及び化粧品も提供することができる。

前記化粧料の種類は特に限定されず、例えば、化粧水、乳液、クリーム、パック、洗浄料等のスキンケア化粧料；口紅、ファンデーション等のメーキャップ化粧料；頭

髪用化粧品等が挙げられ、その剤型は特に制限されず任意である。また、皮膚外用剤としては、軟膏、各種皮膚用薬剤等が挙げられる。

本発明の皮膚外用剤及び化粧品において、本発明の抗酸化剤、更にはコラゲナーゼ活性阻害剤又はヒアルロニダーゼ活性阻害剤の配合割合は、その種類及び配合される他の成分の種類や量、形態等に応じて適宜選択できるが、通常、皮膚外用剤又は化粧品全量に対して、アセロラ種子抽出物の乾燥物換算で 0.001~20 重量%、好ましくは 0.01~10 重量%である。

本発明の皮膚外用剤又は化粧品には、本発明の所望の効果を損なわない範囲で、通常、皮膚外用剤原料や化粧品原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、油剤、界面活性剤、潤滑剤、アルコール類、水溶性高分子剤、ゲル化剤、保湿剤、緩衝剤、防腐剤、抗炎症剤、増粘剤、香料、ビタミン類、本発明の抗酸化剤以外の抗酸化剤等が挙げられる。使用に際しては、これらから 1 種又は 2 種以上を適宜選択して配合することができる。

本発明の食料品は、前記本発明の抗酸化剤を含んでおれば良く、食料品の種類は特に限定されず、例えば、飴、飲料、ジャム、チューインガム等が挙げられる。また、その剤型は特に制限されず任意である。

本発明の食料品において、本発明の抗酸化剤の配合割合は、食料品の種類及び該食料品に配合される他の成分の種類や量、形態等に応じて適宜選択できるが、通常、食料品全量に対して、アセロラ種子抽出物の乾燥物換算で 0.001~20 重量%、好ましくは 0.01~10 重量%である。

本発明の食料品には、本発明の所望の効果を損なわない範囲で、通常、食料品原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、アルコール類、甘味料、酸味料、着色料、保存料、香料、賦形剤等が挙げられ、使用に際しては、これらから適宜選択して 1 種又は 2 種以上を配合することができる。

本発明の抗酸化剤、更にはヒアルロニダーゼ活性阻害剤及びコラゲナーゼ活性阻害剤は、アセロラ種子の抽出物を有効成分とし、安全性に優れ、且つ強力な抗酸化作用、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用又はコラゲナーゼ活性阻害作用を有する。本発明の皮膚外用剤、化粧品及び食料品は、本発明の抗酸化剤、更にはヒアルロニダーゼ活性阻害剤又はコラゲナーゼ活性阻害剤を含むので、抗老化作用、しわ防止作用、活性酸素

に起因する食料品の品質保持や酸化防止作用が得られる。加えて、産業廃棄物であったアセロラ種子の有効な利用も可能となる。

実施例

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1

洗浄したアセロラ種子を乾燥後、破碎して得られた粉碎物 6140g に 7 倍重量のメタノールを加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、ろ過し、ろ液を濃縮乾固して抽出物(A)を 225.89g 得た。

この抽出物(A)に水 2000ml を加え、更にヘキサン 1200ml を加えて振とうした後、分液された水層を回収した。この水層に対し、ヘキサンを用いた同様の振とうを更に 2 回繰り返した。ヘキサン層を除いて得られた水層に、酢酸エチル 1200 ml を加えて振とうすることを 10 回繰り返す、分液された酢酸エチル層を集めて濃縮乾固し、濃縮物(A)を 11.48g 得た。次に、濃縮物(A)を、シリカゲル(ワコーシル C-300 : 和光純薬社製)を充填したカラムを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。クロロホルム、クロロホルム : メタノール(97 : 3、9 : 1、8 : 2、6 : 4、4 : 6、2 : 8)、メタノールで順次溶出させた。クロロホルム溶出部を 15 の画分に分け(画分 1~15)、その後のクロロホルム : メタノール溶出部をそれぞれ、画分 16(97 : 3)、17(9 : 1)、18(8 : 2)、19(6 : 4)、20(4 : 6)とした。

各画分の抗酸化活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いた評価法により確認した。すなわち、各画分の試料をシリカゲル薄層プレートに塗付し、展開溶媒により展開した。この際、蛍光指示薬を含有するプレートを用い(K5F Silica Gel 150 Å : Whatman 社製)、展開後、乾燥したプレートに紫外線を照射することで、UV 吸収をもつ試料のスポットを検出した。その後、プレートに安定なラジカルである Diphenyl-p-picrylhydrazyl(DPPH)の 6×10^{-4} M メタノール溶液を噴霧した。DPPH 溶液は紫色を呈しているが、ラジカルが消去されるとその色を失う。このため、ラジカル消去活性をもつ物質のスポット部分では、DPPH ラジカルが消去されることでスポット部分が白く抜けて見える。

画分 1~20 をシリカゲルプレートに塗付し、クロロホルム : メタノール=9 : 1 の溶媒でプレート先端まで展開した後、DPPH 溶液を噴霧した。結果を図 1 に示す。図 1

より、アセロラ種子抽出物には、抗酸化活性を有する多数の物質が含まれていることがわかる。

このうち、画分 19 を、逆相系高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により更に精製した。まず下記溶出条件で粗精製し、更に以下の条件を行うことで精製した。HPLC 条件を以下に示す。

カラム：Hydrosphere C-18[20×250mm](YMC)、流速：5ml/分、温度：35℃

検出：UV at 254nm、Eluent：30%メタノール(0-2min)、30-100%メタノール(2-32min、linear)、100%メタノール(32-40min)、30%メタノール(40-50min)の条件で粗精製した後、アセトニトリル/水(30/70)で最終精製を行って、分画精製物 72mg を得た。

得られた分画精製物に対し、各種スペクトル測定を行った。得られたデータを以下に示す。

マスマスペクトル：[M-H]⁻ 447

紫外線吸収スペクトル：(EtOH) 256.5nm、352.00nm、H-NMR ケミカルシフト：500MHz 溶媒 CD₃OD、0.94ppm(d:J=6.1Hz)、6.91ppm(d:J=8.2Hz)、7.31ppm(d, d:J=8.2,2.1Hz)、7.34 ppm(d:J=2.1Hz)、6.20ppm(d:J=2.1Hz)、6.37ppm(d:J=2.1 Hz)、3.33ppm(m:J= 9.5,9.3Hz)、3.41ppm(m:J= 9.5Hz)、3.74ppm(d,d:J=9.3,3.3 Hz)、4.21ppm(d,d:J= 3.3Hz)、5.35ppm(d:J=1.7Hz)、C-NMR ケミカルシフト：125.8MHz 溶媒 CD₃OD、17.7ppm、72.0ppm、72.1ppm、72.2ppm、73.3ppm、94.8ppm、99.9ppm、103.6ppm、106.0ppm、116.4ppm、117.0ppm、122.9ppm、123.1ppm、136.3ppm、146.5ppm、149.9ppm、158.6ppm、159.4ppm、163.3ppm、166.0ppm、179.7ppm。

マスマスペクトルにおいて、脱プロトン化分子と考えられるイオンが m/z447 に観測され、分子量は 448 と考えられた。H-NMR では、0.94ppm は CH₃、6.91ppm、7.31ppm、7.34ppm は 1,2,4-置換ベンゼン、6.20ppm、6.37ppm は 1,2,3,5-置換ベンゼンの ¹H に帰属された。3.33~5.35ppm には 5 種類のピークが観測された。また、¹³C-NMR スペクトルでは 21 本のピークが観測され、70-74ppm の 4 本のピークは>CH-O-と考えられ、179.7ppm には共役カルボニルに帰属できるピークが観測された。これらデータよりケルセチン配糖体の可能性が示唆されたため、更に高分解能マスマスペクトルの測定及び、ケルセチン配糖体で分子量 448 であるケルシトリン標品の NMR スペクトルとの比較を行った。高分解能マスマスペクトル測定を行った結果、精密重量 447.0917 が得られ、C、H、O を元素種として組成計算を行った。その結果、

^{13}C -NMR スペクトルで観測された炭素数 21 を満足する組成式 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ が算出され、分子式は $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ と決定された。更に NMR スペクトルを、クエルシトリン(ケルセチン-3-ラムノシド)標品のスペクトルと比較した結果、一致したため、アセロラ種子の抽出物より分離精製された物質はクエルシトリンであると同定した。

クエルシトリンは、フラボノイドの一つで自然界に広く分布しており、特にドクダミに豊富に含まれることが知られている。以上の結果から、アセロラ種子にクエルシトリンが含まれ、該クエルシトリンが抽出物中の抗酸化活性に関与する物質の 1 つであることが判った。

実施例 2

洗浄したアセロラ種子 100g を破碎し、3 倍体積の水を加え、室温で一晩振とうした。全量をガラスフィルター、 $0.65\mu\text{m}$ フィルター及び $0.22\mu\text{m}$ フィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物 1g を得た。

次に、リノール酸を用いた抗酸化活性測定(ロダン鉄法)により得られた抽出物の抗酸化活性を測定した。

即ち、2.5%(w/v)リノール酸(99.5%エタノール溶液)2ml 及び 0.05M リン酸緩衝液(pH7.0)4ml の反応液に、アセロラ種子の抽出物 0.4mg、99.5%エタノール 2ml 及び蒸留水 2ml からなる混液を混合し、褐色ネジ口瓶に入れ 10ml の試験液を調製した。また、アセロラ種子抽出物の代わりに α -トコフェロール又は BHA を用い、反応液中にアセロラ種子の抽出物と同量含まれるように同様の操作を行い、各々試験液を調製し、これらを正の対照とした。コントロールにはアセロラ種子抽出物を添加せず、99.5%エタノール 2ml 及び蒸留水 2ml のみを反応液に添加した試験液を用いた。得られた各試験液を暗所にて 40°C で保存したものを本検、 4°C で保存したものを盲検として、経時的に被検物を取り出し以下の方法により測定を行った。試験は 14 日間行った。

まず、被検物 0.1ml、75%エタノール 9.7ml、30%ロダンアンモニウム水溶液 0.1ml の混液に、 $2 \times 10^{-2}\text{M}$ の塩化第一鉄(3.5%塩酸溶液)0.1ml を加えてから正確に 3 分後 500nm における吸光度を測定した。盲検についても同様に測定し、 Δ 吸光度=(本検の吸光度)-(盲検の吸光度)とした。試料の酸化が始まると吸光度は上昇し、最高点に達した後、酸化されるべき試料が少なくなるにつれて吸光度は減少する。従って、吸光度のピークが早く、きはじめるほど抗酸化活性は弱いといえる。また、酸化率を用い

て各試験液の抗酸化活性を比較した。酸化率は、コントロールの酸化(Δ 吸光度)を100%として、以下の式で求めた。酸化率が高いほど抗酸化活性が低いことを意味する。

$$\text{酸化率(\%)} = ([\text{試料の } \Delta \text{ 吸光度}] / [\text{コントロールの } \Delta \text{ 吸光度}]) \times 100$$

吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。図3において、(C-1)はコントロール、(C-2)は α -トコフェロール、(C-3)はBHA、(E-2)は実施例2で調製したアセロラ種子抽出物、(E-3)は実施例3で調製したアセロラ種子抽出物、(E-4)は実施例4で調製したアセロラ種子抽出物、(E-5)は実施例5で調製したアセロラ種子抽出物を夫々示す。

実施例3

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が25体積%の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物を1.69g得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

実施例4

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が50体積%の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物2.27gを得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

実施例5

洗浄したアセロラ種子100gを破碎し、3倍体積の、エタノール含量が75体積%の含水エタノール水溶液を加え、室温で一晩振とうした。全量を実施例2と同様なフィルターでろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物2.50gを得た。

得られた抽出物を用いて実施例2と同様に抗酸化活性を測定した。吸光度の経時的変化の結果を図2に、試験開始後14日目の各試料溶液の酸化率を図3に示す。

図2及び3より、アセロラ種子の抽出物には明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは代表的抗酸化剤である α -トコフェロール、BHAと比較して、同等又は同等以上であることが判った。更に、実施例2～5の結果より、抽出溶媒と

して用いる含水エタノール中のエタノールの割合を変化させることで、抗酸化活性の強さをコントロールできることが判る。

実施例 6

洗浄したアセロラ種子 760g を破碎し、5 倍重量のメタノールを加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、ろ過し、ろ液を濃縮乾固して抽出物 12.36g を得た。この抽出物に水 300ml を加え、更にヘキサン 100ml を加えて振とうした後、分液された水層を回収した。この水層に対し、ヘキサンを用いた同様の振とうを更に 3 回繰り返した。ヘキサン層を除いて得られた水層に、酢酸エチル 100ml を加えて振とうすることを 6 回繰り返し、分液された酢酸エチル層を集めて濃縮乾固し、固形分 0.41g を得た。

得られたアセロラ種子の抽出物の抗酸化活性を実施例 2 と同様にロダン鉄法により測定した。この際、試験期間は 20 日間とした。試験開始後 20 日目の各試料溶液の酸化率を図 4 に示す。図 4 において、(C-1)はコントロール、(C-2)は α -トコフェロール、(C-3)は BHA、(E-6)は実施例 6 で調製したアセロラ種子抽出物を夫々示す。

図 4 より、アセロラ種子の抽出物の酢酸エチル画分には、抽出物そのものと同様に明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは、 α -トコフェロールよりも強いことが判った。

実施例 7

洗浄したアセロラ種子 70g を破碎し、4 倍重量の、1,3-ブチレングリコール含量が 30 重量%の 1,3-ブチレングリコール水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、上清を 0.22 μ m フィルターでろ過し、アセロラ種子の抽出物を溶液として 124.12g 得た。

得られたアセロラ種子の抽出物の抗酸化活性を以下の DPPH ラジカル消去による方法により測定した。結果を表 1 に示す。

250mM 酢酸緩衝液(pH=5.5)1600 μ l にエタノール 1200 μ l、検体 400 μ l(任意の濃度に調製)を混合し、30°C、5 分間ブレインキュベートした。この液に 500 μ M DPPH /エタノール溶液を 800 μ l 添加混合し、30°C、30 分間放置後、517nm の吸光度を測定した。 α -トコフェロールについても同様の操作を行い、これを正の対照とした。コントロールには、試料溶液の代わりにその溶媒を用いて同様の操作を行ったものを用いた。測定された吸光度から、次式によりラジカル消去率を算出した。

$$\text{消去率(\%)} = (1 - [\text{試料の吸光度}] / [\text{コントロールの吸光度}]) \times 100$$

試料溶液の試料濃度を段階的に変更して上記消去率の測定を行い、DPPH ラジカルの消去率が 50% になる試料溶液の濃度を求め、DPPH ラジカル 50% 消去濃度とした。よって、この数値が低いほどラジカル消去能が高いことを意味する。

表 1

測定試料	DPPH ラジカル 50% 消去濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
実施例 7 の抽出物	115.24
α -トコフェロール	110.13

表 1 より、実施例 7 の抽出物は α -トコフェロールと同等のラジカル消去能を有することが判った。

実施例 8

洗浄したアセロラ種子 1500g を破碎し、2 倍重量の、1,3-ブチレングリコール含量が 30 重量% の 1,3-ブチレングリコール水溶液を加え、室温で一晩攪拌した。全量を遠心後、上清を 0.22 μm フィルターでろ過し、アセロラ種子抽出物を溶液として 2327g 得た。

得られたアセロラ種子抽出物の抗酸化活性を、実施例 2 と同様にロダン鉄法により測定した。但し、アセロラ種子抽出物は溶液であることから、水とエタノールを用いて必要濃度に希釈して添加し、アセロラ種子抽出液のコントロールには、添加したアセロラ種子抽出液と同様の溶媒組成でアセロラ種子抽出物を含まないものを用いた。また、試験期間は 7 日とした。

吸光度の経時的変化の結果を図 5 に、試験開始後 7 日目の各試料溶液の酸化率を図 6 に示す。図 6 において、(C-1) はコントロール、(C-2) は α -トコフェロール、(C-3) は BHA、(E-8) は実施例 8 で調製したアセロラ種子抽出物を夫々示す。

図 5 及び 6 より、アセロラ種子抽出物には明らかにリノール酸の酸化抑制効果があり、またその強さは、 α -トコフェロール、BHA と比較して、同等又は同等以上であることが判った。

ところで、従来よりビタミン C が抗酸化作用を有することが知られているので、上記で調製したアセロラ種子抽出液中のビタミン C 量を測定し、上記アセロラ種子抽出液における抗酸化作用が含有されるビタミン C のみによるものか否かを検討した。

まず、上記で調製したアセロラ種子抽出液 100g 中に含有されるビタミン C 量を測

定したところ、57mg/100g(酸化型ビタミン C : 56mg/100g+還元型ビタミン C : 1mg/100g)であった。そこで、上記で調製したアセロラ種子抽出液 100g を蒸発乾固したところ、固形分 975mg が得られた。次いで、実施例 2 と同様にロダン鉄法により抗酸化活性を測定した。この際、本実施例のアセロラ種子抽出物は溶液であることから、上記と同様、反応液中に固形分として 0.4mg 含まれるように希釈して添加した。またコントロールにも上記と同様、添加したアセロラ種子抽出液と同様の溶媒組成でアセロラ種子抽出物を含まないものを用いた。なお、測定は 7 日間で行った。対照として、該固形分 0.4mg 中に含まれるビタミン C 0.023mg ($0.4\text{mg} \times (57\text{mg}/975\text{mg})$) を用いて同様に抗酸化活性を測定した。

試験開始後 7 日目の酸化率は、アセロラ種子抽出物が 1.9%であったのに対して、ビタミン C 単独のものは 115.8%であった。

以上の結果より、アセロラ種子抽出物中に含まれるビタミン C は、該抽出物の抗酸化作用にはほとんど寄与していないことが判った。

更に、本発明におけるアセロラ種子抽出物において、実施例 1 で確認した抗酸化作用を示す物質の 1 つであるケルシトリンについて、上記で調製したアセロラ種子抽出物中に含有されるか否かを実施例 1 と同様に測定した。その結果、ケルシトリンを含有していることが判った。

ところで、従来、例えば、特開平 7-300581 号公報において、ケルシトリンが抗酸化作用を有することが提案されている。そこで、上記アセロラ種子抽出液における抗酸化作用が含有されるケルシトリンのみによるものか否かを以下の方法で検討した。

まず、ケルシトリンはポリフェノールの 1 種であるので、上記で調製したアセロラ種子抽出液中のポリフェノール量を Folin-Denis 法により測定したところ、抽出液 100g 中の固形分 975mg に占めるポリフェノールの割合は 25%であった。従って、上記で調製したアセロラ種子抽出液の固形分中に含まれるケルシトリン量は、最大でも 25%である。この結果に基づいて、上記ビタミン C との比較試験と同様に、実施例 2 と同様にロダン鉄法により抗酸化活性を測定した。この際、測定は 7 日間で行った。対照として、該固形分 0.4mg 中にケルシトリンが 32%(最大量でも 25%であるので、それ以上の量)含まれると仮定した場合のケルシトリン 0.128mg を用いて同様に抗酸化活性を測定した。

その結果、試験開始後 7 日目の酸化率は、アセロラ種子抽出物が 1.9%であったのに対して、ケルシトリン単独のものは 6.9%であった。

以上の結果より、アセロラ種子抽出物に含まれるケルシトリンは、該抽出物の抗酸化作用の有効成分の 1 つではあるが、該抽出物の抗酸化作用はケルシトリンのみの作用ではなく、しかも、アセロラ種子抽出物は、ケルシトリン単独による抗酸化作用よりも優れていることが判った。

参考例 1

実施例 2～5 で調製した各アセロラ種子抽出物について、以下の方法によりコラゲナーゼ活性阻害作用を測定した。

測定方法

〔試薬の調製〕

基質溶液：Pz-ペプチド(BACHEM 社製)0.39mg を、0.1M トリス塩酸緩衝液(pH7.1、含 20mM 塩化カルシウム)1ml に溶解して使用した(0.5mM に相当)。

酵素溶液：コラゲナーゼ(TYPE IV、シグマ社製)5mg を蒸留水 1ml に溶解させ 100 μ l ずつ分注し、 -20°C で保管する。使用時に蒸留水で 50 倍に希釈して反応に用いた。

〔コラゲナーゼ活性阻害作用測定法〕

実施例 2 の抽出物は 15mg/ml、実施例 3、4、5 の抽出物は 0.5mg/ml の濃度となるように、それぞれの抽出溶媒で溶解して調製を行い、これらを試料溶液とした。これらの試料溶液 50 μ l、コラゲナーゼ溶液 50 μ l 及び基質溶液 400 μ l を混合し、 37°C で 30 分間インキュベーションした。次いで、25mM クエン酸溶液 1ml で反応を停止し、酢酸エチル 5ml で抽出した。遠心分離(3000rpm、10 分間)後、酢酸エチルを対照として、酢酸エチル層の波長 320nm における吸光度を測定した。対照には、試料溶液の代わりに各抽出溶媒を用い、また、それぞれのブランクとして、酵素溶液の代わりに蒸留水を加えて同様の操作を行った。

これらの値からコラゲナーゼ活性阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$$

但し、A：試料溶液の 320nm における吸光度、B：試料溶液ブランクの 320nm における吸光度、C：対照溶液の 320nm における吸光度、D：対照溶液ブランクの 320nm における吸光度である。

上記方法で実施例 2～5 の抽出物のコラゲナーゼ活性阻害率を求めた。結果を表 2

に示す。

表 2

試料	濃度 (mg/ml)	コラゲナーゼ 活性阻害率(%)
実施例 2	15	35.9
実施例 3	0.5	78.0
実施例 4	0.5	76.6
実施例 5	0.5	78.9

参考例 2

実施例 8 で調製したアセロラ種子抽出物について、参考例 1 と同様の方法によりコラゲナーゼ活性阻害作用を測定した。但し、実施例 8 の抽出物は溶液であることから、アセロラ種子抽出物が固形物として 0.5mg/ml の濃度となるように抽出溶媒である 30 重量% 1,3-ブチレングリコール水溶液で希釈したものを試料溶液とした。このようにして実施例 8 の抽出物のコラゲナーゼ活性阻害率を求めた結果、71.5%であった。

参考例 3

実施例 8 で調製した抽出物のヒアルロニダーゼ活性阻害作用を測定した。ヒアルロニダーゼ活性阻害測定は、Morgan-Elson 法を応用した前田有美恵らの方法(食衛誌、31 巻、233-237、1990 年)にて行った。

測定方法

〔試薬の調製〕

酵素溶液：牛精巢ヒアルロニダーゼ(和光純薬工業(株)製)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終酵素活性を 400 ユニット/ml に調整した。

酵素活性化溶液：compound 48/80 (シグマ社製)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終濃度を 0.1mg/ml に調整した。

基質溶液：ヒアルロン酸カリウム(和光純薬工業(株)製)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終濃度を 0.4mg/ml に調整した。

ホウ酸溶液：ホウ酸 4.95g に水 50ml を加え、1N 水酸化ナトリウム溶液で pH=9.1 にし、水を加えて 100ml に調整した。

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド(p-DAB)試薬：10N 塩酸 12.5ml と酢酸 87.5ml の混液に p-DAB(和光純薬工業(株)製)を 10g 溶解し冷蔵保存する。使用直前に酢酸で 10 倍希釈して用いた。

〔ヒアルロニダーゼ活性阻害作用測定法〕

実施例 8 の抽出物は溶液であることから、アセロラ種子抽出物が固形物として 1mg/ml の濃度となるように抽出溶媒である 30 重量%1,3-ブチレングリコール水溶液で希釈したものを試料溶液とした。この試料溶液 0.2ml に酵素溶液 0.1ml を加えて、37℃で 20 分間放置した。次に、酵素活性化溶液 0.2ml を加えて 37℃で 20 分間加温し、さらに基質溶液 0.5ml を加えて 37℃で 40 分間反応させた後、0.4N の水酸化ナトリウム水溶液を 0.2ml 加えるとともに氷冷して反応を停止させた。ホウ酸溶液 0.2ml を加えてホットブロックバス(TOYO SEISAKUSHO、MODEL TPB-32)により 100～120℃で 5 分間加熱後氷冷し、p-DAB 試薬 6ml を加えて 37℃で 20 分間加温して発色させ、585nm における吸光度を蒸留水を対照として測定した。対照には、試料溶液の代わりに抽出溶媒を用い、またそれぞれのブランクとして、酵素溶液の代わりに 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)を加えて同様の操作を行った。

これらの値からヒアルロニダーゼ活性阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$$

但し、A：試料溶液の 585nm における吸光度、B：試料溶液ブランクの 585nm における吸光度、C：対照溶液の 585nm における吸光度、D：対照溶液ブランクの 585nm における吸光度である。

上記方法で実施例 8 の抽出物のヒアルロニダーゼ活性阻害率を求めた結果、94.5%であった。

参考例 4

1997 年 3 月 26 日付厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」に従ってアセロラ種子抽出物の安全性試験を行なった。アセロラ種子抽出物としては、実施例 8 で調製したアセロラ種子抽出物を用いた。結果を表 3 に示す。

ラットを用いる単回経口投与毒性試験

ラット 2 群(対照群、投与群)に対して、雌雄各 5 匹/群にて試験を行い、投与群には体重あたり 2g/kg 投与した。

モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験

モルモット 3 匹の健常皮膚に 24 時間閉塞貼付を行い、投与後 24 時間、48 時間及び 72 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

モルモットを用いる 14 日間皮膚累積刺激性試験

モルモット 3 匹の健常皮膚に、14 日間連続の開放系で 1 日 1 回塗布を行い、試験期間中の毎日、塗布前及び塗布後 24 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

モルモットを用いる皮膚感作性試験

モルモット 3 群(対照群、塗布群、DNCB 群)に対して、5 匹/群にて Adjuvant and Patch Test 法に準じて試験を行い、塗布後 24 時間及び 48 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

モルモットを用いる皮膚光毒性試験

モルモット 10 匹の背部皮膚に森川藤風らの方法に準じて試験を行い、紫外線照射後 24 時間、48 時間及び 72 時間にそれぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

モルモットを用いる皮膚光感作性試験

モルモット 3 群(対照群、投与群、TCSA 群)に対して、5 匹/群にて Ajuvant and Strip 法に準じて試験を行い、紫外線照射後 24 時間及び 48 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行った。

ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験

ウサギ 2 群(非洗眼群、洗眼群)に対して、3 匹/群にて試験を行った。点眼後、非洗眼群はそのままにし、洗眼群は微温の生理食塩水で約 1 分間洗浄し、その後 1 時間、24 時間、48 時間及び 72 時間後に、角膜、虹彩及び結膜の状態について観察し、AFNOR の区分から判定を行った。

細菌を用いる復帰突然変異試験

プレインキュベーション法により、S9mix 無添加と S9mix 添加の場合について測定を行った。

- ・使用菌株：Salmonella typhimurium TA100、TA98、TA1535、TA1537
- ・使用菌株：Escherichia coli WP2uvrA

哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

哺乳類の培養細胞(CHL/IU 細胞)を用いて 3 群(陰性対照群、被検物質群、陽性対照群)に対して、短時間処理法(6 時間処理：S9mix 無添加及び S9mix 添加)及び連続処理法(24 時間及び 48 時間処理)で検討を行った。

表 3

安全性試験項目	結果
1)ラットを用いる単回経口投与毒性試験	毒性なし
2)モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験	刺激性なし
3)モルモットを用いる14日間皮膚累積刺激性試験	刺激性なし
4)モルモットを用いる皮膚感作性試験	感作性なし
5)モルモットを用いる皮膚光毒性試験	光毒性なし
6)モルモットを用いる皮膚光感作性試験	光感作性なし
7)ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験	眼刺激性なし
8)細菌を用いる復帰突然変異試験	変異原性なし
9)哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験	異常なし

処方例 1

グリチルリチン酸ジカリウム 0.20 重量部、クエン酸 0.10 重量部、クエン酸ナトリウム 0.30 重量部、実施例 7 で調製したアセロラ種子の抽出物 5.00 重量部及び 1,3-ブチレングリコール 5.00 重量部を混合して、精製水を加えて全体量を 80.0 重量部にして 50℃で攪拌しながら溶解して抽出物含有水溶液を調製した。

次いで、テトラオレイン酸 POE(60)ソルビトール 0.90 重量部、モノオレイン酸ソルビタン 0.10 重量部、適量の防腐剤及びエタノール 10.00 重量部を混合して、50℃で攪拌しながら溶解した。続いて、得られた溶液を、最初に調製した抽出物含有水溶液に少量ずつ加えて、50℃で混和攪拌した。均一に混和したら、更に攪拌しながら 50℃から 30℃に液温を下げ、30℃になったらところで攪拌を止め、適量の香料及び精製水を加えて全体量を 100.00 重量部にした。再度、混和攪拌し、均一に混和させて化粧水を調製した。

処方例 2

スクワレン 10.00 重量部及び適量の防腐剤を混合し、精製水を加えて全体量を 70.00 重量部に調整し、80℃に加温して溶液(1)を調製した。また、カルボキシビニルポリマー 0.10 重量部及びキサントガム 0.20 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(2)を調製した。更に、トリエタノールアミン 0.10 重量部及び 1,3-ブチレングリコール 5.00 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(3)を調製した。更にまた、ヒアルロン酸ナトリウム 2.00 重量部及び実施例 8 で調製したアセロラ種子の抽出物 5.00 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(4)を調製した。

次いで、適量の精製水に溶液(1)を少量ずつ加え、80℃で混和攪拌し、更に攪拌しながら、溶液(2)を加え、続いて溶液(3)を加えた。均一に混和したら、攪拌しながら溶液を50℃に下げて、50℃になったところで、溶液(4)を加え、更に精製水を加えて全体量を100重量部に調整した。溶液が30℃になるまで再度攪拌し、30℃になったところで攪拌を止め、均一に混和された乳液を調製した。

処方例3

POE(20)ソルビタンモノステアレート 2.00 重量部、POE ソルビタンテトラオレート 0.50 重量部、モノステアリン酸グリセリル 0.50 重量部、ステアリン酸 7.00 重量部、セチルアルコール 3.00 重量部、パルミチン酸セチル 3.00 重量部、ホホバ油 7.00 重量部、パラフィン 3.00 重量部及び適量の防腐剤を混合して、80℃で攪拌しながら溶解し溶液(1)を調製した。一方、実施例8で調製したアセロラ種子の抽出物 5.00 重量部、1,3-ブチレングリコール 7.00 重量部及び精製水 62 重量部を混合して、80℃で攪拌しながら溶解し溶液(2)を調製した。

次いで、溶液(2)に溶液(1)を少量ずつ加え、乳化し、攪拌しながら冷却して40℃に降温したところで攪拌を止め、均一に混和されたクリームを調製した。

処方例4

濃縮グレープフルーツジュース 100g、糖類 150g、はちみつ 15g、実施例2と同様の条件で調製したアセロラ種子の抽出物(A)1.5g 及び適量の香料に、全体量が1000gとなるように精製水を混合した。次いで、95℃で20分間殺菌し、100ml ずつ無菌的にビンに充填してグレープフルーツジュースを製造した。

処方例5

POE(30)POP(6)デシルテトラデシルエーテル 0.6 重量部、エタノール 10.0 重量部及びメチルパラベン 0.1 重量部を50℃で混合攪拌した溶液に、別途、クエン酸ナトリウム 0.1 重量部、ピロリドンカルボン酸ナトリウム 1.0 重量部、1,3-ブチレングリコール 4.4 重量部及び適量の精製水を50℃で混合攪拌した溶液を加えて、攪拌しながら30℃まで冷却した。更に、実施例8で調製したアセロラ種子の抽出物 2.0 重量部を添加して混合攪拌した後、最後に適量の精製水を加えて全量を100重量部に調整した。再度、攪拌して均一に混和して化粧水を調製した。

処方例6

1,3-ブチレングリコールの配合量を3.5重量部及び実施例8で調製したアセロラ種

子の抽出物の配合量を 5.0 重量部に変更した以外は処方例 5 と同様に化粧水を調製した。

比較処方例 1

1,3-ブチレングリコールの配合量を 5.0 重量部に変更し、実施例 8 で調製したアセロラ種子の抽出物を配合しなかった以外は処方例 5 と同様に化粧水を調製した。

実施例 9

処方例 5 で調製した化粧水について、実施例 2 と同様のロダン鉄法によりリノール酸の酸化抑制作用を測定した。比較として、アセロラ種子抽出物を含まない比較処方例 1 で調製した化粧水についても同様に酸化抑制作用を測定した。

本実施例では、実施例 2 において反応液に加えたアセロラ種子抽出物 0.4mg、99.5% エタノール 2ml 及び蒸留水 2ml の代わりに、処方例 5 又は比較処方例 1 で調製した各化粧水 2ml、99.5% エタノール 1.8ml 及び蒸留水 0.2ml を加えて試験を行った。

吸光度の経時的変化の結果を図 7 に示す。また、試験開始後 28 日目の処方例 5 で調製した化粧水試料の酸化率を、比較処方例 1 で調製した化粧水試料の 21 日目の酸化率(Δ 吸光度)を 100% として、実施例 2 と同様に求めた結果、7.2% であった。

図 7 及び前記酸化率試験の結果から明らかなように、アセロラ種子抽出物を配合して調製した処方例 5 の化粧水は、比較処方例 1 の化粧水に比べて優れたリノール酸の酸化抑制作用を示し、また、28 日経過後もその作用は持続していた。

これにより、アセロラ種子抽出物を配合した化粧水には、安定性に優れた抗酸化作用があることが確認された。

実施例 10

アセロラ種子抽出物を配合した化粧水の抗酸化作用が、化粧水調製後 1 か月以上が経過しても持続し有効であることを確認するため、処方例 5、処方例 6 及び比較処方例 1 で調製した化粧水を下記条件で 6 か月間保存し、保存後の DPPH ラジカル消去作用の変化を実施例 7 と同様な抗酸化試験を行って評価した。

保存方法

処方例 5 及び処方例 6 の化粧水を調製後、遮光条件下、4℃、25℃、40℃でそれぞれ 6 か月間保存し、調製直後、調製 2 週間後、及び調製後 1、2、3、4、6 か月経過後に DPPH ラジカル消去試験を実施した。また、比較として、比較処方例 1 の化粧水についても同様に、保存及び試験を行った。

本実施例では、実施例 7 において反応液に加えたアセロラ種子抽出物 400 μ l の代わりに、処方例 5 又は処方例 6 で調製した化粧水 400 μ l を加えて試験を行った。尚、DPPH ラジカル消去率(%)は、処方例 5 及び処方例 6 で調製した化粧水の代わりに、同条件で保存した比較処方例 1 で調製した化粧水を添加した試料の吸光度をコントロールとして、実施例 7 と同様にして求めた。

処方例 5 及び処方例 6 で調製した化粧水について 6 か月間行った DPPH ラジカル消去試験の結果を、各々図 8 及び図 9 にそれぞれ示す。

図 8 及び図 9 から明らかなように、アセロラ種子抽出物を配合した処方例 5 及び処方例 6 の化粧水は優れた DPPH ラジカル消去作用を示し、その作用は、40°C という厳しい条件下で 6 か月間保存した後も失われなかった。また、アセロラ種子抽出物の配合量が多い処方例 6 の化粧水の方が高い抗酸化作用を示し、持続性においても優れていた。

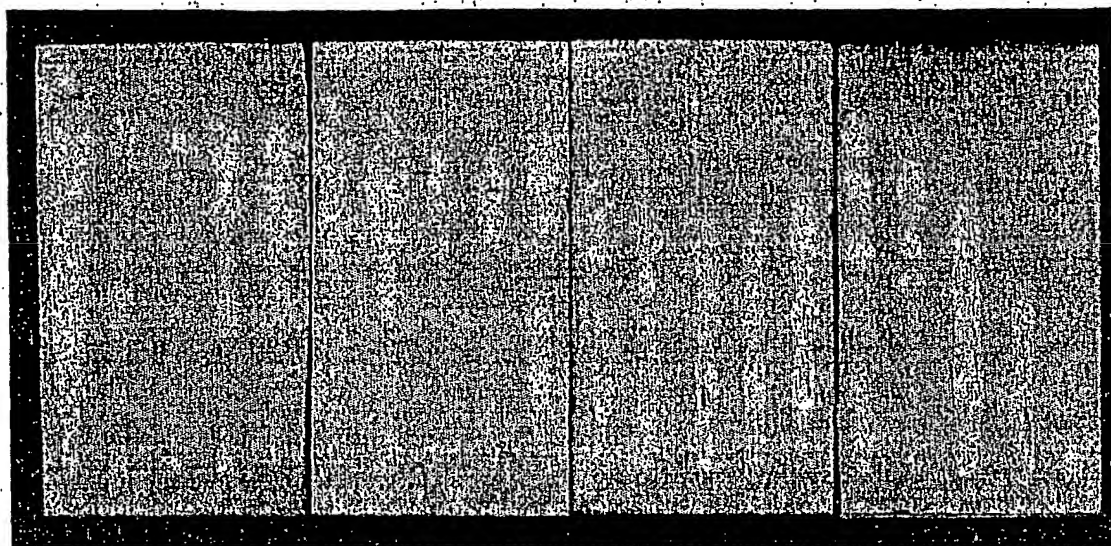
以上より、アセロラ種子抽出物を配合した化粧水には、長期間、特に高温での長期保存にも強い、優れた抗酸化作用があること、そしてその作用は、アセロラ種子抽出物の配合量が高いほどより期待できることが確認された。

請求の範囲

1. アセロラ種子の抽出物を有効成分として含む抗酸化剤。
2. アセロラ種子の抽出物が、ケルシトリンを含む請求の範囲 1 の抗酸化剤。
3. 請求の範囲 1 の抗酸化剤を含む皮膚外用剤。
4. 請求の範囲 1 の抗酸化剤を含む化粧品。
5. 請求の範囲 1 の抗酸化剤を含む食料品。

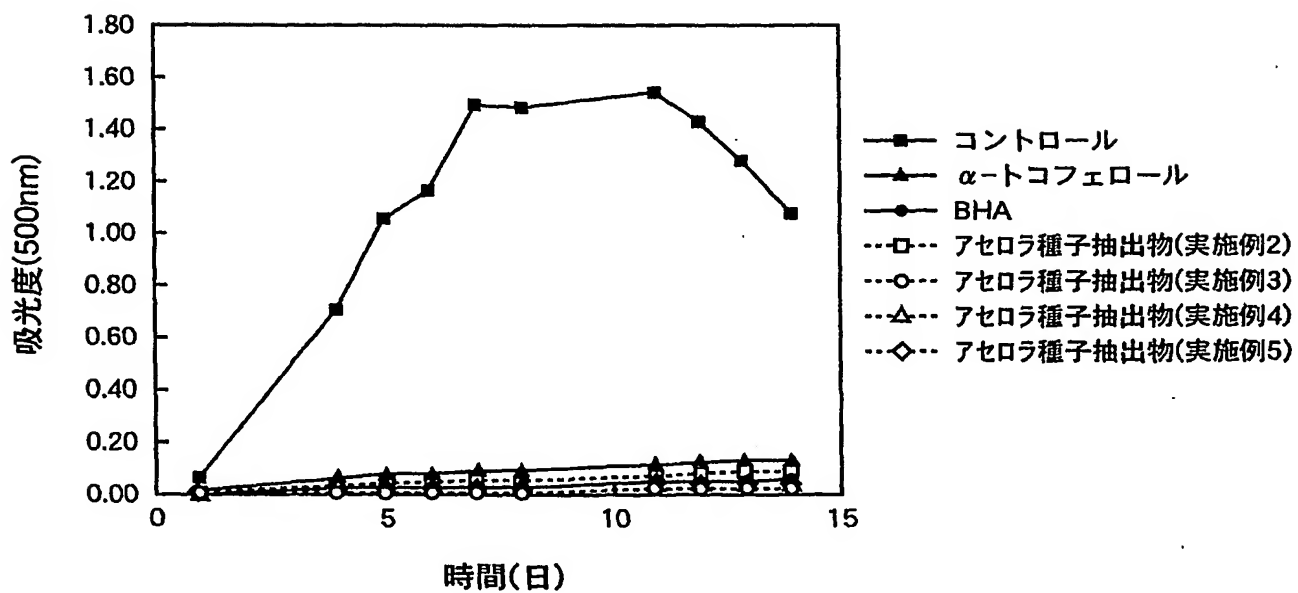
1/5

図1



画分 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

図2



BEST AVAILABLE COPY

2/5

図3

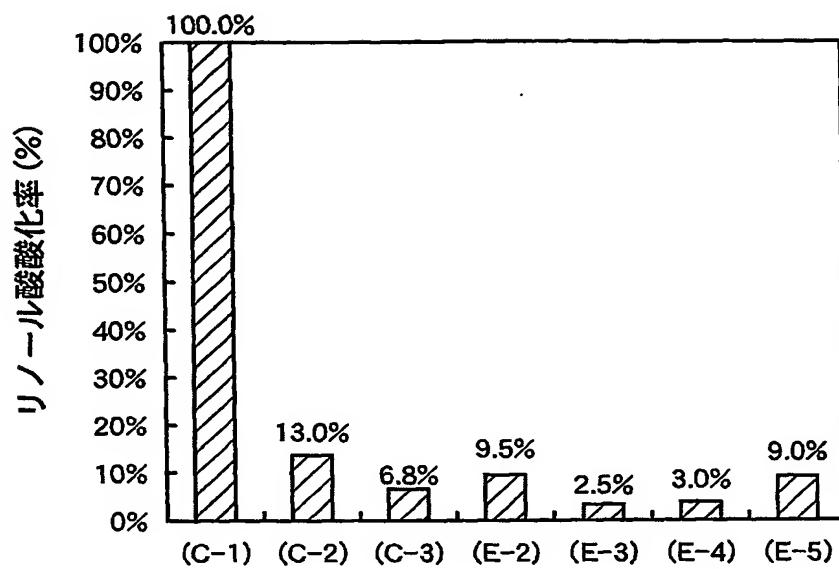
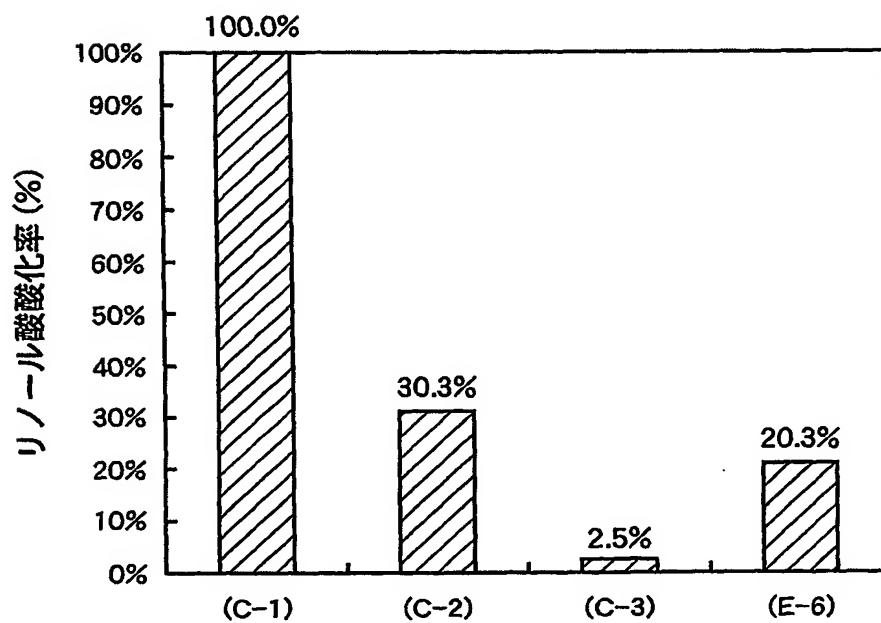


図4



3/5

図5

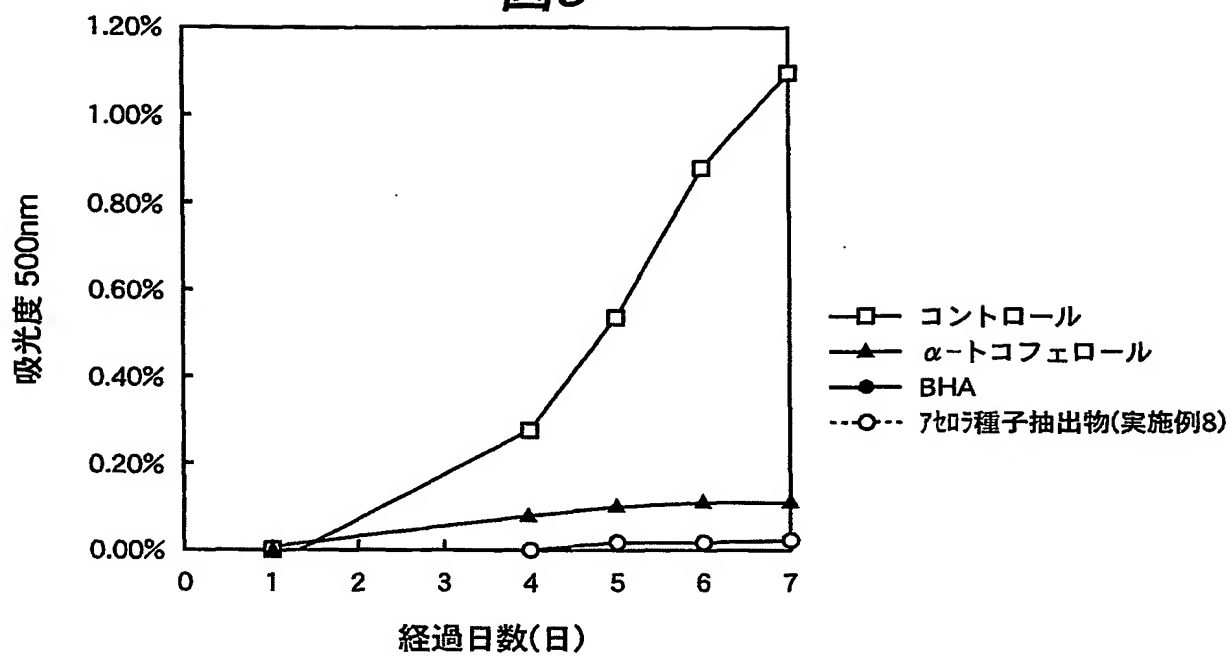
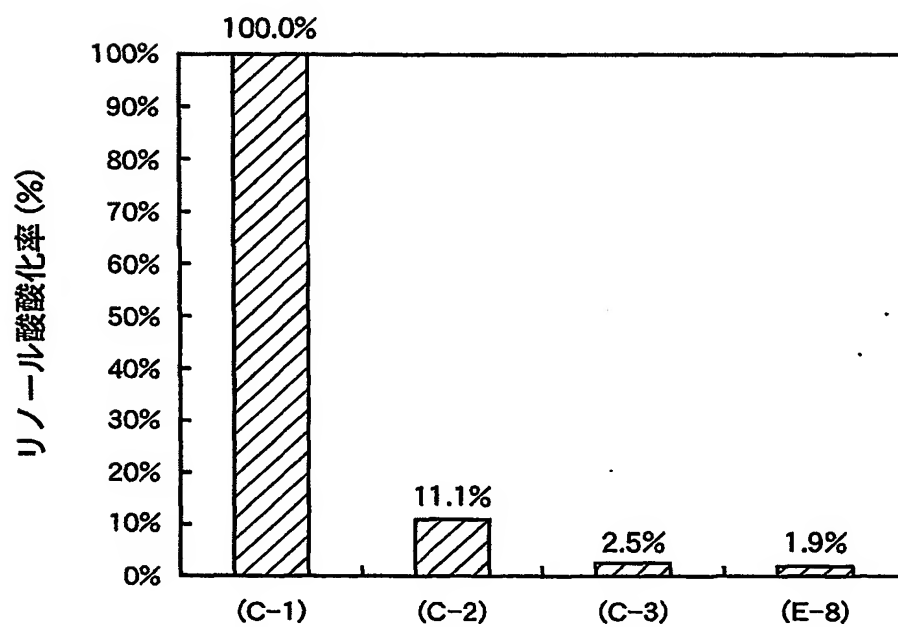
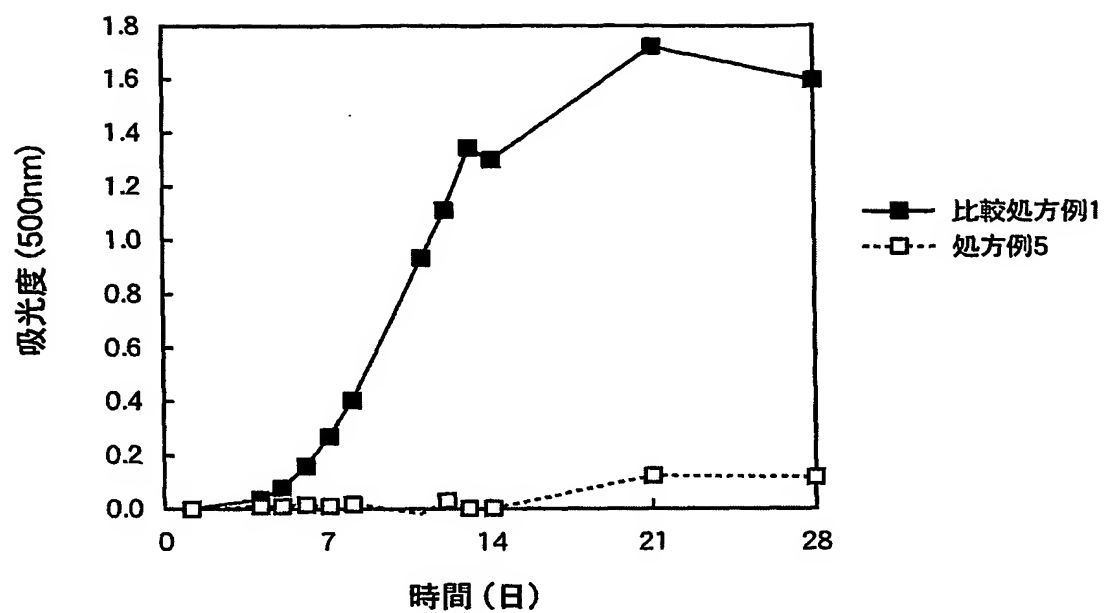


図6



4/5

図7



5/5

図8

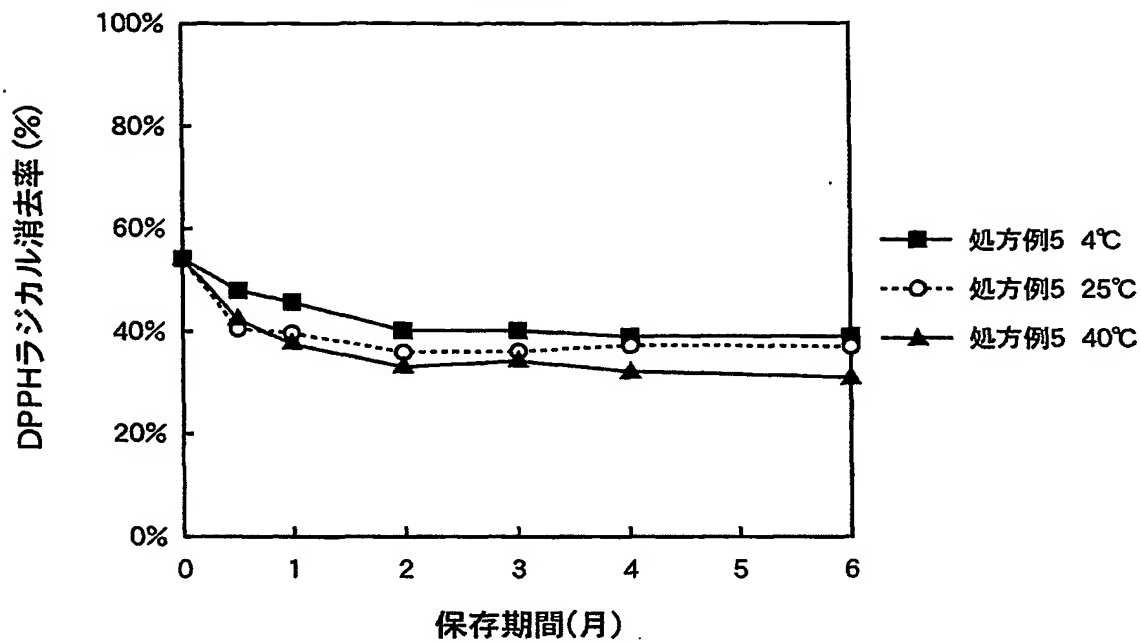
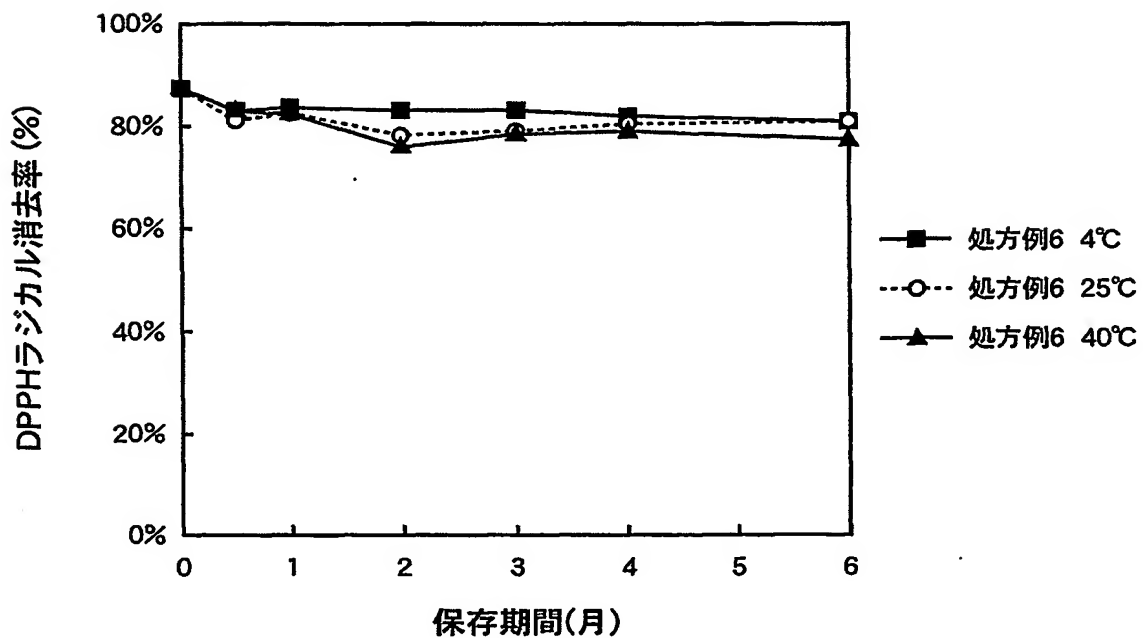


図9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14885

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C09K15/34, A23L1/30, A61K7/00, A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C09K15/34, A23L1/27-1/308, A61K7/00-7/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-226218 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 21 August, 2001 (21.08.01), Claims (Family: none)	1-5
A	JP 7-61915 A (Sansei Seiyaku Kabushiki Kaisha), 07 March, 1995 (07.03.95), Claims (Family: none)	1-5
A	JP 2000-212026 A (Kose Corp.), 02 August, 2000 (02.08.00), Claims (Family: none)	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 February, 2004 (17.02.04)

Date of mailing of the international search report
02 March, 2004 (02.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14885

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2-200610 A (Nichirei Corp.), 08 August, 1990 (08.08.90), Claims (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C09K15/34、A23L1/30、A61K7/00、A61K7/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C09K15/34、A23L1/27-1/308、A61K7/00-7/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)、BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-226218 A(一丸ファルコス株式会社)2001.08.21、特許請求の範囲(ファミリーなし)	1-5
A	JP 7-61915 A(三省製薬株式会社)1995.03.07、特許請求の範囲(ファミリーなし)	1-5
A	JP 2000-212026 A(株式会社コーセー)2000.08.02、特許請求の範囲(ファミリーなし)	1-5
A	JP 2-200610 A(株式会社ニチレイ)1990.08.08、特許請求の範囲(ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.02.2004

国際調査報告の発送日

02.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 陽子

4V

9279

電話番号 03-3581-1101 内線 3483